

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Exprese V-ATPázy v hypoxii u buněk neuroblastomu

V-ATPase expression in hypoxic conditions in neuroblastoma cells

Bakalářská práce

Kateřina Kittlerová

Vedoucí práce: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. MUDr. Tomáše Eckschlagera, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze:

Podpis:

Poděkování

Ráda bych tímto mnohokrát poděkovala prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. za jeho cenné rady, ochotu a trpělivost při vypracování mé bakalářské práce. Dále Mgr. Marii Belhajové a Mgr. Tereze Černé, Ph.D. hlavně za jejich trpělivost, vstřícnost a vytvoření příjemného pracovního prostředí, a celému kolektivu Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. A samozřejmě i mé úžasné rodině.

Abstrakt

Nádorová onemocnění se v dnešní době řadí mezi nejčastější příčiny smrti na celém světě, proto se stále pracuje na nových protinádorových léčivech a terapeutických přístupech. U dětí a mladistvých jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou smrti. Mezi jeden z často diagnostikovaných nádorů u dětí a mladistvých patří neuroblastom. Jedná se o maligní embryonální nádor periferního nervového systému. K léčbě nádorových onemocnění se s dalšími terapeutickými postupy jako je chirurgické odstranění a ozáření nádoru používá léčba cytostatiky - chemoterapie. Cisplatina je jedno z nejpoužívanějších cytostatik, její účinnost je ale ztěžována vznikem rezistence v průběhu léčby. Vakuolární ATPáza (V-ATPáza) acidifikuje některé buněčné organely včetně lysozomů, což může vést k lysozomální sekvestraci některých látek včetně cytostatik a tím tedy zabránění léčivu dostat se k terapeutickému cíli. Klíčovou roli v regulaci lysozomální aktivity hraje transkripční faktor EB (*TFEB*). Tato práce se zabývá expresí d podjednotky vakuolární ATPázy (*ATP6V0D1*) a *TFEB* u neuroblastomové buněčné linie senzitivní UKF-NB-4 a rezistentní vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} v normoxii a hypoxii. Po vystavení neuroblastomových buněk rezistentních vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} došlo ke zvýšení exprese genu *ATP6V0D1* vůči normoxii. V případě *TFEB* došlo ke zvýšení exprese v senzitivní neuroblastomové linii UKF-NB-4 vystavené hypoxii. To ukazuje schopnost těchto genů adaptovat se na hypoxické podmínky.

Klíčová slova: neuroblastom, chemorezistence, V-ATPáza, hypoxie

Abstract

Tumor diseases belong to one of the most common death causes all around the world these days, therefore scientists still work on new therapeutic procedures. Tumor diseases are the second most common death causes among kids and juvenile. One of the frequently diagnosed tumor among kids and juvenile is neuroblastoma. Neuroblastoma is malignant embryonic tumor of the peripheral nervous system. Chemotherapy is used as tumor treatment by therapeutic procedures such as surgical removal and tumor irradiation. Cisplatin is one of the most applied cytostatics, however its efficiency is lowered despite of creating resistance during the treatment. Vacuolar ATPase (V-ATPase) acidifies some of the cell organelles including lysosomes, which can lead to lysosomal sequestration of some of the substances including cytostatics and therefore the cure can't get to the therapeutic target. Key role in lysosomal activity regulation performs transcription factor EB (*TFEB*). This study deals with expression of d subunit of vacuolar ATPase (*ATP6V0D1*) and *TFEB* in neuroblastoma sensitive cell line UFK-NB-4 and resistant to cisplatin UKF-NB-4^{CDDP} in normoxia and hypoxia. After exposure of neuroblastoma resistant cells to cisplatin the expression of *ATP6V0D1* gene raised compared to normoxia. In case of *TFEB* the expression in sensitive neuroblastoma line UFK-NB-4 raised when exposed to hypoxia. That shows the ability of these genes to adapt at hypoxic conditions.

Key words: neuroblastoma, chemoresistance, V-ATPase, hypoxia

Obsah

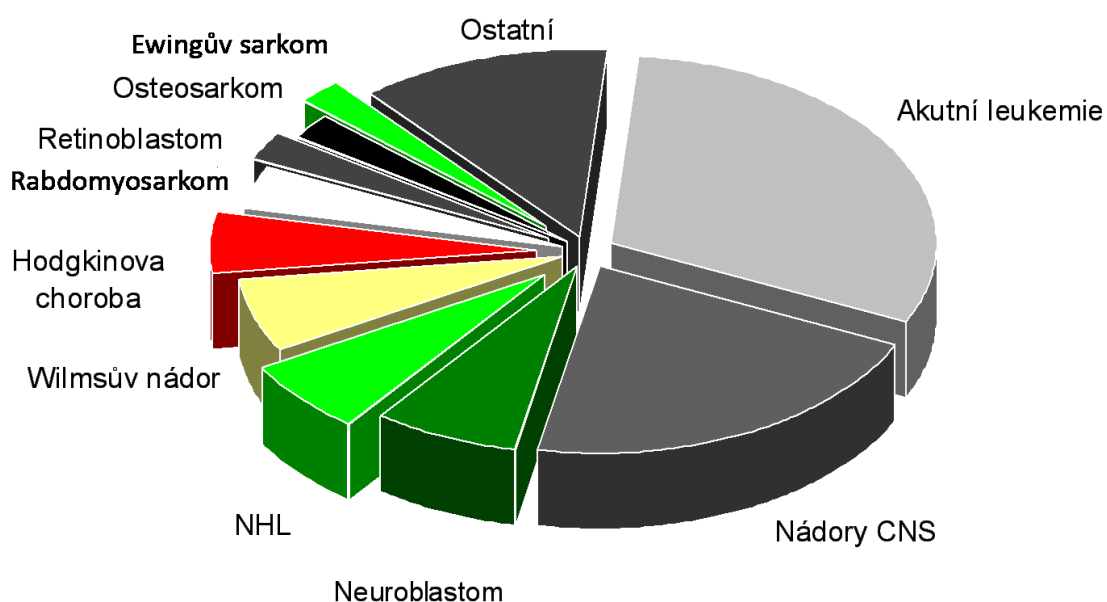
Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	8
1.1 Neuroblastom	8
1.2 Protinádorová chemoterapie	12
1.2.1 Mechanismy účinku cytostatik	12
1.2.2 Cisplatina	13
1.3 Chemorezistence	15
1.3.1 Chemorezistence indukovaná hypoxií	16
1.4 <i>TFEB</i>	16
1.4.1 Regulace aktivity <i>TFEB</i>	16
1.4.2 MiT rodina	19
1.4.3 Síť genů CLEAR	19
1.5 V-ATPáza	20
1.5.1 Struktura a funkce V-ATPázy	20
1.5.2 Inhibitory V-ATPázy	22
2. Cíl práce	23
3. Materiál a metody	24
3.1 Materiál	24
3.2 Metody	25
3.2.1 Kultivace neuroblastomových buněčných linií	25
3.2.2 Příprava vzorků na experiment	25
3.2.3 Izolace RNA	25
3.2.4 Reverzní transkripce RNA	26
3.2.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)	27
4. Výsledky	28
4.1 Sledování exprese genů <i>ATP6V0D1</i> a <i>TFEB</i> v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a UKF-NB-4 ^{CDDP} metodou RT-PCR	28
5. Diskuze	30
6. Závěr	32
Použitá literatura	33

Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát
BAK1	proapoptotický protein "Bcl-2"
BAX	proapoptotický protein "Bcl-2 associated-X"
BCL2	antiapoptotický protein "B-cell lymphoma-2"
CDDP	cisplatina
CLEAR	koordinovaná lysozomální exprese a regulace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ERK2	signál regulující kináza 2
FBS	fetální hovězí sérum
GTPáza	GTP fosfohydroláza
IMDM	"Iscove's modified Dulbecco's" médium
INPC	"International Neuroblastoma Pathology Classification"
MCOLN1	mucolipin 1
MDR	mnohočetná léková rezistence
MITF	melanocytový indukční transkripční faktor
MiTF	transkripční faktor spojený s mikroftalmií
mTORC1	"mammalian target of rapamycin complex 1"
MYCN	gen odvozený od myelocytomatózy "myelocytomatosis viral related neuroblastoma derived gen"
NLS	jaderný lokalizační signál
PBS	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl
PET scan	pozitronová emisní tomografie
Rag	"recombination activating gene"
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
TFE3	transkripční faktor E3
TFEB	transkripční faktor EB
TFEC	transkripční faktor EC
V-ATPáza	vakuolární adenosintrifosfatáza
VDAC1	"Voltage Dependent Anion Channel 1"
VIP	vazoaktivní intestinální polypeptid

1. Úvod

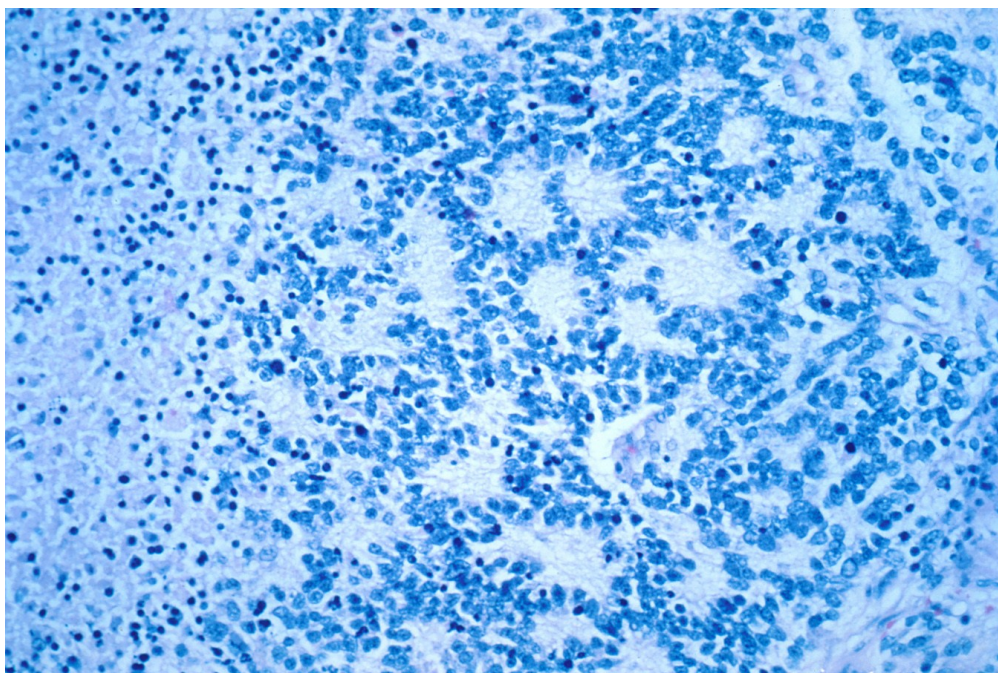
V České republice je každý rok diagnostikováno více než 100 000 nových případů zhoubných onemocnění, z toho dětská nádorová onemocnění dětí a mladistvých představují téměř 1 %. U dětí jsou nádory druhou nejčastější příčinou smrti hned po úrazech. V druhé polovině 20. století se vymezila dětská onkologie oproti onkologii dospělých na základě významných rozdílů v biologii, etiologii a léčbě nádorů. Mezi nejvýznamnější rozdíly patří zastoupení jednotlivých typů nádorů u dětí a dospělých. U dětí se jedná především o nádory vycházející z neuroektodermu (např. neuroblastom) a z mezodermu, zatímco u dospělých se nejčastěji vyskytují epiteliální nádory (karcinomy), které jsou u dětí výjimkou [1].



Obr. 1: Zastoupení jednotlivých typů nádorů v dětském věku. Přejato a upraveno z [1].

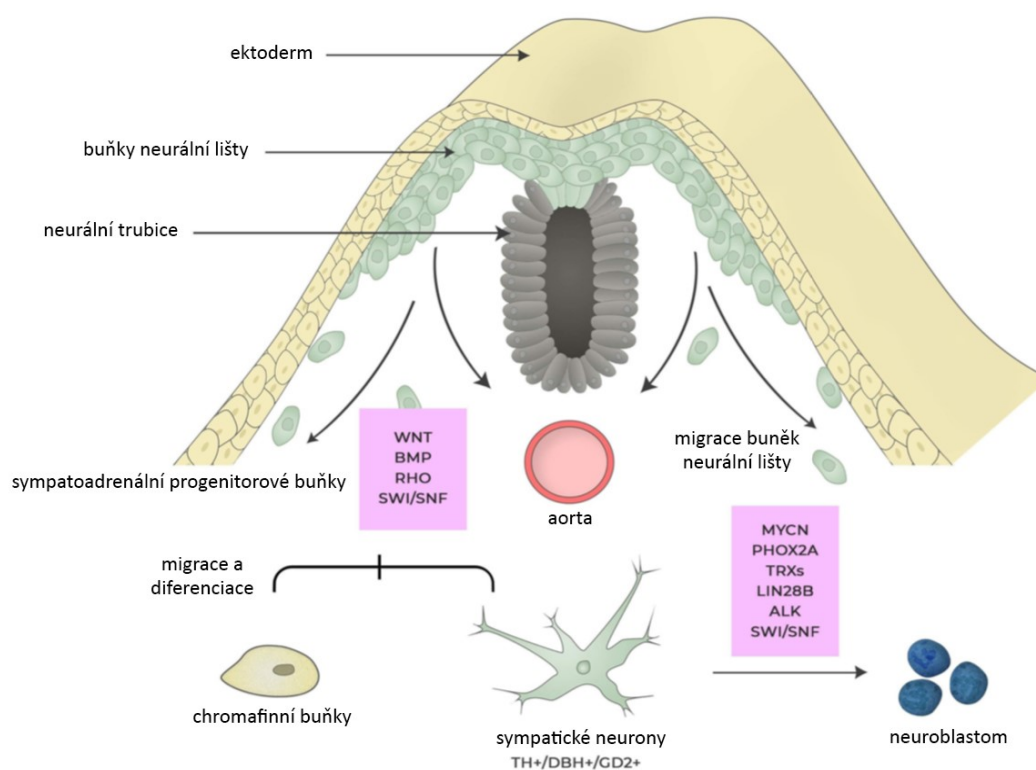
1.1 Neuroblastom

Neuroblastom je maligní embryonální nádor periferního nervového systému [2]. Z makroskopického hlediska se jedná o křehký, měkký, šedobílý a často prokrvácený nádor. Z hlediska mikroskopického ho tvoří malé kulaté buňky často formující rozety a obsahující neuroendokrinní granula obklopená neurony (Obr. 2, str. 9) [3].



Obr. 2: Mikroskopický pohled na neuroblastom typicky uspořádaný do rozet. Zvětšeno 40x [4].

Neuroblastom je nejběžnější a nejčastěji diagnostikovaný extrakraniální solidní nádor dětského věku [2]. Vyskytuje se u více než 7 % pacientů s maligním nádorem mladších 15 let. Každý rok v ČR onemocní neuroblastomem 25-30 dětí. Onemocnění je diagnostikováno v 50 % u dětí do 2 let věku, v 75 % do 4 a 90 % do 10 let věku dítěte [5]. Prekurzorem neuroblastomu jsou nezralé a nediferencované buňky sympatiku (buňky neurální lišty), které vznikají z neurální trubice. Buňky neurální lišty během vývoje migrují do celého těla a diferencují se do různých buněčných typů (Obr. 3, str. 10). V průběhu embryogeneze osidlují dřeň nadledvin, sympatická ganglia a paraganglia. Tvoří součásti periferního nervového systému, ale podílejí se i na stavbě žláz s vnitřní sekrecí [6]. Celý proces je regulován externí signalizací, aktivací transkripčních programů a epigenetickými ději. Dysregulace faktorů zapojených do tohoto procesu může vyvolat změny ve specifikaci a diferenciaci buněk způsobující vznik hyperplastických lézí, které nakonec mohou vést k maligní transformaci a vzniku neuroblastomu [2].



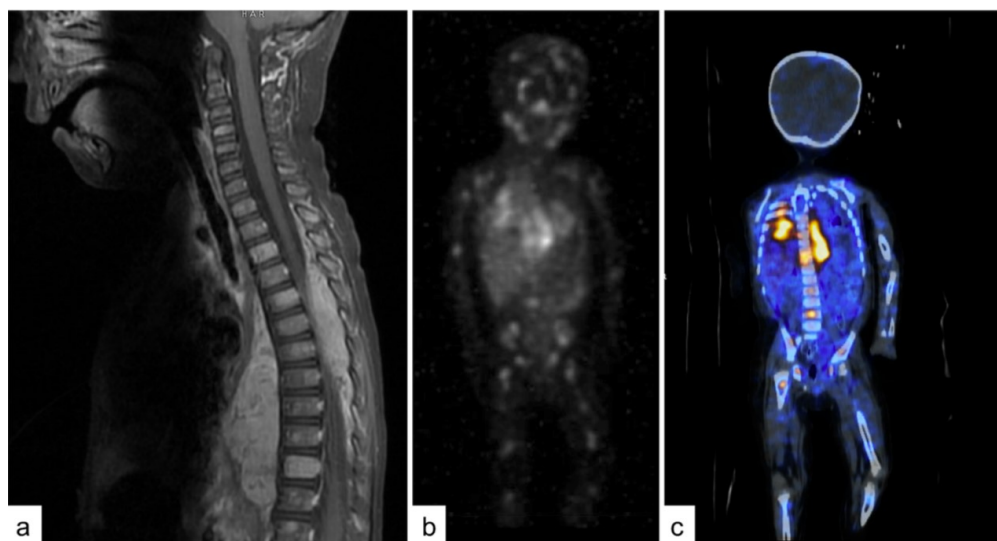
Obr. 3: Vývoj neuroblastomu z neurální lišty. Přejato a upraveno z [2].

Většina primárních nádorů (asi 65 %) se vyskytuje v dutině břišní, přičemž asi polovina vzniká v dřeni nadledvin. Další lokalizace primárních nádorů může být v mediastinu, krční oblasti a v pánevních sympatických gangliích. Asi u 1 % případů se nepodaří lokalizovat primární nádor [7]. Neuroblastom metastazuje lymfatickou a hematogenní cestou. Tvorba a lokalizace metastáz je závislá především na věku. V kojeneckém věku se vyskytují typické metastázy do jater, kostní dřeně a do kůže [5]. Navzdory přítomnosti metastáz mají tyto děti obvykle poměrně příznivou prognózu. Většina z nich je vyléčena, někdy tyto nádory mohou spontánně regresovat. U starších dětí nádor metastazuje převážně do lymfatických uzlin, kostí a kostní dřeně a prognóza bývá horší [8].

Periferní neuroblastické nádory rozdělujeme dle aktuální klasifikace "International Neuroblastoma Pathology Classification" (INPC) na 4 základní skupiny: neuroblastom, ganglioneuroblastom, ganglioneuroblastom-nodulární a ganglioneurom [6]. Neuroblastom je složen z malých uniformních buněk (neuroblastů), které obsahují denzní hyperchromatická jádra obklopená malým množstvím cytoplazmy [9]. Tento nádor je charakterizován genetickými změnami. Nejdůležitější abnormitou je amplifikace onkogenu

MYCN, delece krátkého raménka chromosomu 1 (del 1p) a delece dlouhého raménka chromosomu 11 (del 11p), dále zmnožení genetického materiálu na dlouhém raménku chromosomu 17 (17q gain) [3].

Diagnóze předcházejí nespecifické příznaky. Mezi projevy v kojeneckém a batolecím věku patří zejména podrážděnost, nechutenství, retardace psychomotorického vývoje a makrocefalie. V pozdějším věku se jedná o nadměrnou únavu, bolesti hlavy a změny chování [6]. Mezi paraneoplastické příznaky, které se vyskytují asi u 5 % pacientů, patří: nadměrná produkce katecholaminů způsobující záchvaty hypertenze, bolesti hlavy a zrudnutí, sekrece vazoaktivního intestinálního polypeptidu vyvolávající akutní průjmy a akutní myoklonická encefalopatie. Diagnóza může být stanovena histologicky nebo na základě nálezu neuroblastomových buněk v kostní dřeni pokud je dřev masivně infiltrována [5]. K určení rozsahu onemocnění se využívá ultrazvukové vyšetření, scintigrafie s metaiodobenzylguanidinem a výpočetní tomografie s intravenózním kontrastem nebo magnetická rezonance (Obr. 4). Díky těmto vyšetřením je možné stanovit diagnózu nádorové expanze a rozsah onemocnění u 95 % pacientů [6].



Obr. 4: Zobrazení lokalizace neuroblastomu: a - postižení páteřního kanálu v hrudní oblasti a postižení několika obratlů - zobrazení magnetickou rezonancí; b - primární hrudní nádor a rozsáhlé metastázy - PET scan; c - zobrazení fúze PET a výpočetní tomografie [10].

1.2 Protinádorová chemoterapie

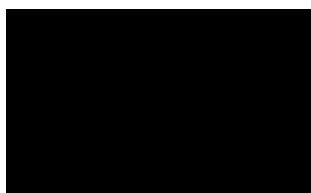
S dalšími terapeutickými postupy, jako je chirurgické odstranění a ozáření nádoru, se používá k léčbě nádorových onemocnění chemoterapie - léčba cytostatiky. Cílem cytostatické léčby je především zpomalení nebo úplné zastavení růstu nádorových buněk či dokonce jejich zničení [11]. Dnes se tyto látky podávají v kombinacích, které umožňují podávání vyšších dávek cytostatik a jejichž účinky se sčítají nebo dokonce potencují. Rovněž se využívají léky s ochranným účinkem proti některým nežádoucím účinkům cytostatik. Tato podpůrná léčiva se podávají současně s cytostatikem nebo následně po jeho aplikaci a pomáhají tedy zmenšovat nežádoucí účinky [12]. Cytostatika přednostně poškozují rychle se dělící maligní buňky, především dochází ke zbrzdění proliferace, následně může dojít i k indukci apoptózy eventuálně jiného typu buněčné smrti. Pomalu dělící se buňky, tedy ty zdravé, zůstávají z větší části neovlivněny. Některé zdravé tkáně se fyziologicky vyznačují rychlým dělením, proto se objevují nežádoucí účinky. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří porucha krvetvorby (snížení počtu bílých krvinek - leukopenie, krevních destiček - trombocytopenie i červených krvinek - anemie), vypadávání vlasů jako následek poškození vlasových folikulů, dále poruchy trávicího ústrojí v důsledku poškození epitelu, zvýšená náchylnost k infekcím nebo neplodnost [13]. Cytostatika často mívají i teratogenní, mutagenní a kancerogenní účinky [11].

1.2.1 Mechanismy účinku cytostatik

Cytostatika nejčastěji poškozují DNA, ale některá inhibují mitózu (vinca alkaloidy a taxany) nebo proteosyntézu (asparaginasa). Dle způsobu, jakým cytostatika poškozují nukleové kyseliny, je lze rozřadit do několika skupin. Jednotlivá cytostatika zasahují do buněčného cyklu specificky v různých fázích. První skupinou jsou tzv. bifunkční alkylační cytostatika, která tvoří kovalentní spoje mezi dvěma vlákny nukleových kyselin a tím brání replikaci DNA. Interkalační cytostatika se vsouvají mezi závit DNA a rozplétají ji, čímž brání jejímu zdvojení. Některá cytostatika blokují reparační mechanismus nukleových kyselin a jiná zase inhibují zásadní enzymy pro syntézu nukleových kyselin. Poslední skupina cytostatik může nastartovat proces programované buněčné smrti - apoptózy [12].

1.2.2 Cisplatina

Během zkoumání vlivu elektrických polí na růst buněk *E. Coli* byla objevena biologická aktivita sloučenin platiny, která vedla k vývoji jednoho z nejpoužívanějších protinádorových léčiv - cisplatiny (CDDP) neboli cis-diamin-dichlórplatinatého komplexu (Obr. 5) [14]. Podobá se alkylačním látkám a má i podobný mechanismus účinku. CDDP vytváří vazbu s dusíkem purinových a pyrimidinových bází v molekule DNA a zabíjí nejrychleji množící se buňky, které by teoreticky měly být ty nádorové [15]. Léčba cisplatinou se nejčastěji používá u germinálních nádorů varlat, karcinomů ovaria, bronchogenního karcinomu, a také je široce používaným činidlem v léčbě neuroblastomu [16]. Léčebný režim cisplatiny obvykle zahrnuje sérii intravenózních infuzí podávaných každé 3-4 týdny [14]. Účinnost cisplatiny je významně ztěžována vývojem rezistence během průběhu léčby [17]. Nejobávanějším nežádoucím účinkem je nefrotoxicita, kterou však lze významně omezit správným hydratačním režimem. Pravidelným nežádoucím účinkem je nevolnost a zvracení, které se vyskytuje téměř u 100 % případů [15].

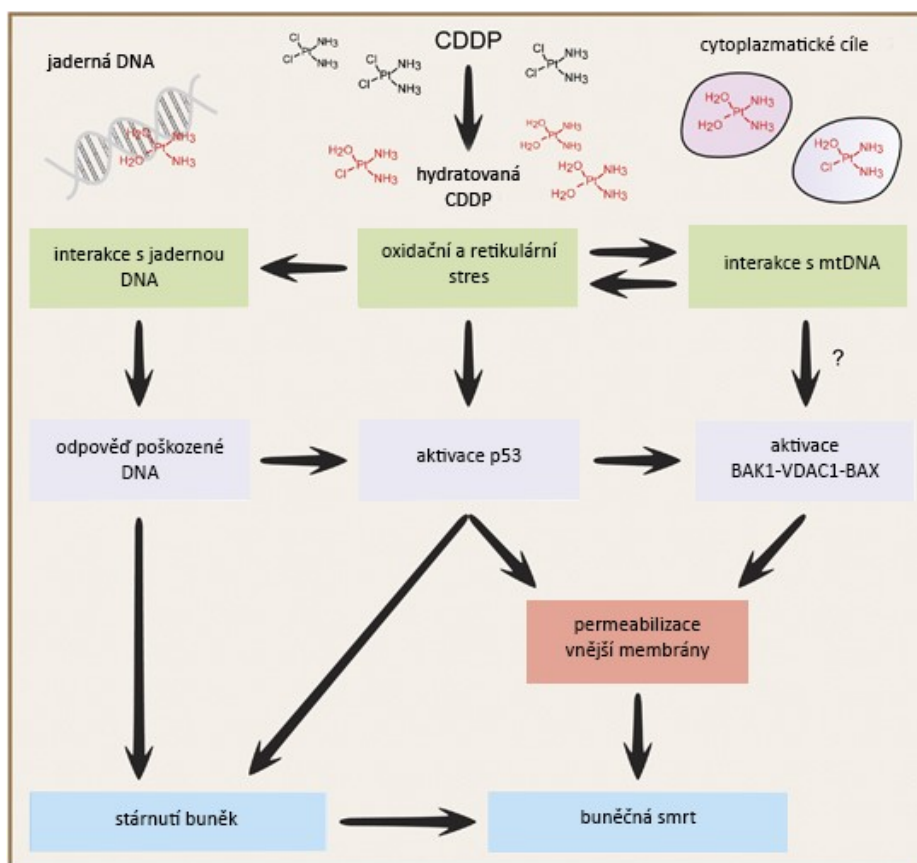


Obr. 5: *Struktura cisplatiny [18].*

1.2.2.1 Mechanismus působení cisplatiny

V krevním oběhu se cisplatina setkává s relativně vysokou koncentrací (100 mM) chloridových iontů, které potlačují hydrolyzu a udržují sloučeninu v neutrálním stavu. Do buněk se CDDP dostává s největší pravděpodobností pasivní difúzí. Po vniknutí do buněk se sníží koncentrace chloridových iontů (asi na 20 mM) a tím se usnadní hydrolyza. Výsledkem je hydratovaná, aktivovaná forma cisplatiny (cis - $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]$), která lépe reaguje s buněčnou DNA [14]. Takto aktivovaná forma CDDP se váže s vysokou afinitou na jadernou DNA, zejména na nukleofilní místa N7 na purinech, čímž podporuje aktivaci reakce na poškození DNA. CDDP může navíc interagovat s několika cytoplazmatickými nukleofily včetně mitochondriální DNA, mitochondriálními a

extramitochondriálními proteiny, proto napomáhá vzniku oxidačního a retikulárního stresu a aktivaci signální transdukční kaskády, která zahrnuje proapoptotické členy rodiny BCL2, BAK1, VDAC1 a BAX a aktivaci proteinu p53 (Obr. 6) [19].



Obr. 6: Mechanismy účinku cisplatinu. Přejato a upraveno z [19].

Signály apoptózy zprostředkované poškozením DNA však mohou být oslabeny a rezistence, která následuje, je hlavním omezením chemoterapie cisplatinou [20].

1.2.2.2 Molekulární mechanismy vzniku rezistence na cisplatinu

Maligní buňky mohou ztratit svou citlivost na cytostatickou / cytotoxickou aktivitu cytostatik včetně CDDP v důsledku genetických a epigenetických změn. Tyto změny mohou zaprvé ovlivnit procesy, které předcházejí navázání CDDP na buněčný cíl (pre-target resistance), zadruhé zesílit schopnost buněk opravit poškození způsobené CDDP (on-target resistance), zatřetí narušit přenos proapoptotických nebo buněčnou sensenci indukujících signálů indukovaných působením CDDP na buňku (post-target resistance) a

začtvrté stimulovat buněčné dráhy umožňující přežití, které antagonizují cytotoxicitu CDDP (off-target resistance). Vznik rezistence k CDDP je obecně multifaktoriální proces. To z části vysvětluje, proč stále chybí účinné strategie pro zvýšení citlivosti nádorů k CDDP [19].

1.3 Chemorezistence

Jak bylo zmíněno v kapitole 1.2. chemoterapie je dnes nejpoužívanější způsob léčby nádorového onemocnění, avšak dochází ke vzniku rezistence k používaným cytostatikům, což často vede k selhání této léčby. Řada nádorových buněk je rezistentní vůči více druhům léčiva - tzv. mnohočetná léková rezistence (MDR), to znamená, že vykazují rezistenci vůči navzájem nepříbuzným léčivům [21]. Hlavní mechanismy chemorezistence jsou: zvýšená oprava DNA, změny exprese nebo modifikace cílové struktury, indukce antiapoptotických nebo inhibice proapoptotických mechanismů, zvýšené vylučování léku z buňky, změny metabolismu léku v buňce nebo v organismu, změny terapeutického cíle a snížená dostupnost léku nádorovým buňkám [9].

Dalším z klíčových mechanismů MDR zodpovědných za vnitřní chemorezistenci je lysozomální sekvestrace. Lysozomální sekvestrace zabraňuje interakci léčivo-cíl, a tím řádnému terapeutickému účinku. Některé cizorodé sloučeniny včetně řady cytostatik se hromadí v kyselých lysozomech, jsou protonovány a dlouhodobě zadržovány, a proto se nemohou dostat do cytoplazmy, kde mají přístup k terapeutickým cílům [16]. Kyselé prostředí způsobené změnami gradientu pH mezi intracelulárními a extracelulárními kompartmenty se může významně podílet na mechanismu rezistence na léčiva. Tyto změny vedou k neutralizaci slabě bazických léků kyselým nádorovým prostředím nebo k výše zmíněné lysozomální sekvestraci léčiv [22]. Lysozomy jsou buněčné organely vejcovitého tvaru obklopeny fosfolipidovou dvojvrstvou, které si udržují kyselé prostředí pomocí funkce vakuolárních ATPáz (V-ATPáz) [23].

1.3.1 Chemorezistence indukovaná hypoxií

Hypoxické prostředí je typické pro solidní nádory. Vztah hypoxie nádorových buněk k rezistenci vůči cytostatikům a radioterapii je znám již několik desetiletí a je považován za jednu z příčin horší prognózy nádorů s rozsáhlými hypoxickými oblastmi. Při radioterapii nízké hladiny kyslíku zabraňují tvorbě zlomů řetězce DNA indukovaných zářením a inhibují opravu poškozené DNA. Adaptace nádorových buněk na hypoxické podmínky přispívá k agresivní povaze nádorů a jejich dediferenciaci a chemorezistenci. Hypoxie významně snižuje citlivost neuroblastomových buněk k řadě cytostatik, proto studium hypoxických buněk uvnitř solidních nádorů může otevřít nové léčebné metody k překonání rezistence a prevence recidivy [24].

1.4 *TFEB*

Transkripční faktor EB (*TFEB*) hraje klíčovou roli při regulaci základních buněčných procesů, jako je lysozomální biogeneze a autofagie. Subcelulární lokalizace a aktivita *TFEB* jsou regulovány fosforylací zprostředkovanou "mammalian target of rapamycin" (mTOR), který se vyskytuje na povrchu lysozomu. Fosforylovaný *TFEB* zůstává v cytoplazmě, zatímco defosforylovaný se translokuje do jádra, kde indukuje transkripci cílových genů. Signální dráha od lysozomu k jádru tedy reguluje buněčný energetický metabolismus pomocí *TFEB* [25].

1.4.1 Regulace aktivity *TFEB*

Aktivita *TFEB* je regulována posttranslačními modifikacemi, protein-proteinovými interakcemi a prostorovým uspořádáním. V buňkách, které mají dostatek živin, je *TFEB* přítomen v cytosolu, kde není aktivní. Při nedostatku živin, hladovění nebo lysozomální dysfunkci se *TFEB* rychle přemístí do jádra a aktivuje transkripci cílových genů, tato buněčná lokalizace je kontrolována fosforylačním stavem *TFEB*. Klíčovou roli při určování subcelulární lokalizace hrají dva specifické serinové zbytky (Ser211 a Ser142). Bylo prokázáno, že fosforylace Ser211 slouží pro navázání chaperonu 14-3-3, což zajišťuje sekvestraci *TFEB* v cytosolu a brání jeho jaderné translokaci pravděpodobně maskováním jaderného lokalizačního signálu (NLS) [25]. Pokud jsou tyto zbytky fosforylovány tak se

TFEB váže na 14-3-3 proteiny a je zachován v cytosolu neaktivní (Obr. 7-A, str. 18) [26]. Fosforylace je zprostředkována mTORC1, ke které dochází na povrchu lysozomů. mTORC1 a signál regulující kináza 2 (ERK2) jsou hlavní proteinové kinázy, které fosforylují *TFEB* za podmínek bohatých na živiny. V přítomnosti živin mechanismus zahrnující komplex V-ATPázy podporuje aktivaci malých GTPáz Rag, které vážou mTORC1 do membrány lysozomů, čímž podporuje jeho aktivaci přes GTPázu Rheb. Při hladovění nebo lysozomovém stresu se mTORC1 uvolňuje z membrány lysozomů a stává se neaktivní, současně indukuje uvolňování lysozomálního Ca^{2+} přes kanál MCOLN1, to aktivuje fosfatázový kalcineurin, který defosforyluje a tím tedy aktivuje *TFEB* a podporuje jeho nukleární translokaci a indukci exprese genů sítě CLEAR (sít' koordinované lysozomální exprese a regulace) (Obr. 7-B, str. 18) [26]. Vyčerpání MCOLN1 inhibuje uvolňování lysozomálního Ca^{2+} a aktivaci kalcineurinu, čímž brání aktivaci *TFEB* a indukci autofagie při nedostatku živin (Obr. 8, str. 18) [25].

Výše popsané signální kaskády zdůrazňují úlohu lysozomu jako signalizačního centra schopného vnímat dostupnost živin a koordinovat aktivaci transkripčního programu. Je zajímavé, že mnoho faktorů, které regulují aktivitu *TFEB* (tj. většina podjednotek V-ATPázy, kanál Ca^{2+} MCOLN1, samotná lysozomální „platforma“), jsou samy o sobě transkripčně regulovány *TFEB*, což dokazuje, že adaptace lysozomů na změny životního prostředí buňky je samo udržitelná reakce. Aktivace *TFEB* také podporuje vlastní transkripci, což představuje další zpětnou vazbu, která dále udržuje signalizaci a funkci lysozomů [25].

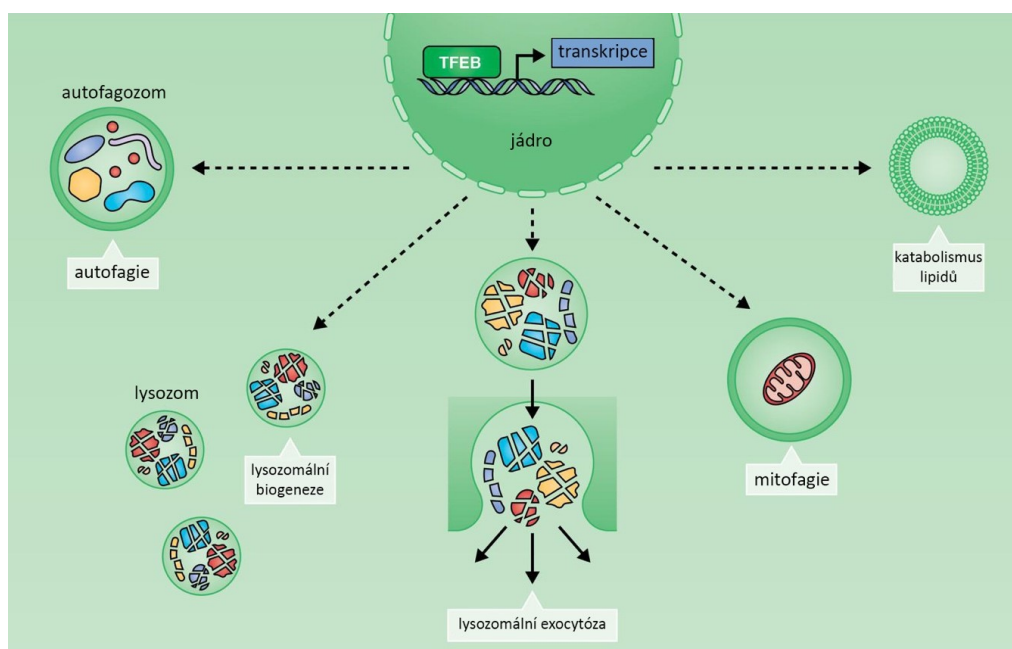
Nedávná studie dokázala, že regulace V-ATPázy proteinovým komplexem mTORC1 zahrnuje *TFEB*, který je nezbytný pro expresi velké skupiny genů reagujících na mTORC1. Jedním z mechanismů, kterým mTORC1 a *TFEB* mohou ovlivnit endocytózu, je regulace hladin V-ATPázy a lysozomů [27].

1.4.2 MiT rodina

TFEB je členem MiT rodiny transkripčních faktorů, do které také patří TFE3, TFEC a MiTF (transkripční faktor spojený s mikroftalmií). Tyto transkripční faktory obsahují aktivační doménu, která je důležitá pro jejich transkripční aktivaci (aktivační doména chybí u TFEC, který je nejvíce odlišným členem rodiny a zdá se, že spíše inhibuje, než aktivuje transkripci). Členové MiT rodiny vážou palindromickou sekvenci E-box CACGTG a také asymetrickou sekvenci M-box TCATGT. *TFEB* kóduje transkripční faktor, který koordinuje expresi lysozomálních hydroláz, membránových proteinů a genů, které se podílejí na autofagii [25].

1.4.3 Síť genů CLEAR

Síť koordinované lysozomální exprese a regulace (CLEAR) se podílí na regulaci procesů spojených s funkcemi lysozomů. Lysozomy se účastní řady základních buněčných procesů včetně endocytózy, autofagie a lysozomální exocytózy. Tyto orgány jsou rozhodující při procesech buněčného systému degradace a recyklace odpadního materiálu [25]. Pomocí metody ChIP (chromatin immunoprecipitation - metoda umožňující detekci interakcí proteinů s DNA) bylo identifikováno 471 přímých cílů *TFEB*, které představují základní součást sítě CLEAR. Tato analýza odhalila komplexní systém regulující expresi, import a aktivitu lysozomálních enzymů, které řídí degradaci proteinů, glykosaminoglykanů, sfingolipidů a glykogenu. Součástí této sítě jsou i nelysozomální enzymy podílející se na degradaci esenciálních proteinů, jako je hemoglobin nebo chitin [28]. *TFEB* je schopen se vázat přímo na prvky CLEAR. Nadměrná exprese *TFEB* vede ke zvýšení počtu lysozomů a zvýšení aktivity lysozomálních enzymů, čímž se zvyšuje lysozomální katabolická aktivita, konkrétně lysozomální biogeneze [25].



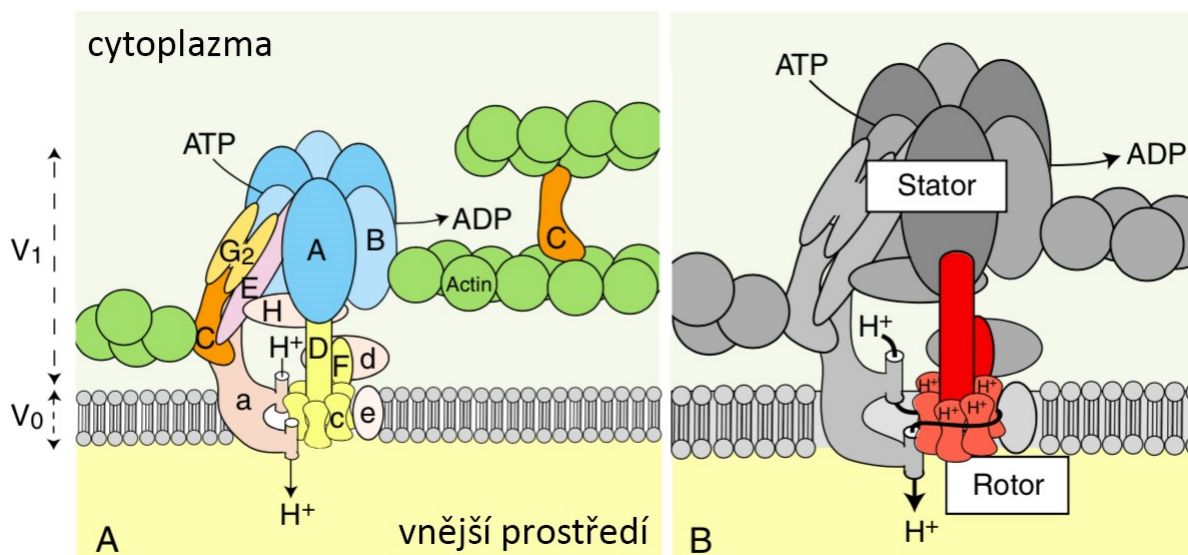
Obr 9: TFEB jako regulátor základních buněčných procesů. Přejato a upraveno z [25].

1.5 V-ATPáza

Eukaryotické vakuolární H^+ adenosintrifosfatázy (V-ATPázy) jsou multiproteinové membránové komplexy, které se skládají ze 2 domén tvořených 14 různými podjednotkami. Jsou to tzv. "protonové pumpy", které přenášejí vodíkové kationty H^+ přes cytoplazmu do buněčných vakuol za spotřeby ATP [29]. V-ATPázy hrají důležitou roli v regulaci pH buněk, zejména udržují neutrální intracelulární a kyselé extracelulární pH. Aktivaci proteáz dochází ke snížení extracelulárního pH, což se podílí na metastázování buněk. Zvýšená aktivita a exprese V-ATPáz u nádorových buněk souvisí s chemorezistencí, progresí nádorů a metastázováním [30].

1.5.1 Struktura a funkce V-ATPázy

Jak již bylo zmíněno, V-ATPáza (Obr. 10-A, str. 21) je složena ze 2 domén (V0 a V1), které jsou tvořeny 14 různými jednotkami [29]. Doména V1 se skládá z osmi různých podjednotek označených písmeny A-H, podjednotka G existuje jako dimer G2. Membránový komplex V0 tvoří čtyři podjednotky označené písmeny a, c, d, e. Kruhová struktura komplexu V0 se skládá ze šesti i více podjednotek c [31].



Obr. 10: Struktura V-ATPázy v membráně eukaryotické buňky. Přejato a upraveno z [31].

Komplexy V0 a V1 jsou spojeny centrální osou rotoru (podjednotky D a F) a periferní stacionární částí (podjednotky C, E, G, H, a), tedy statorem (Obr. 10-B). Periferní část komplexu V1 obsahuje podjednotky B a C, které jsou schopny vázat aktin. Funkce podjednotek d a e není dosud zcela objasněná a zůstává předmětem dalšího zkoumání. Hydrolyza ATP způsobuje rotaci centrální osy spolu s podjednotkami c, což umožňuje translokaci protonů H^+ přes membránu pomocí kanálu podjednotky a. Rotací c podjednotek dojde k přenosu protonů z vnitřní části kanálu v cytoplasmě do vnější části kanálu [31]. V-ATPáza je protonová pumpa, která udržuje acidifikaci membránově vázaných kompartmentů v eukaryotických buňkách. Mezi její hlavní funkce patří okyselení endozomů, lysozomů, fagozomů, autofagozomů a prvků Golgiho aparátu. Specializované buňky včetně osteoklastů, interkalovaných buněk v ledvinách a pankreatických beta buněk obsahují podjednotky V-ATPázy, které mají svou specifickou roli. Takto specializované V-ATPázy jsou vyznačovány začleněním specifických izoform. Specializované V-ATPázy se podílejí na růstu nádorových buněk a jejich metastazování, navíc byla prokázána zvýšená exprese některých podjednotek V-ATPázy v různých typech nádorových buněk. Charakterizace V-ATPáz může rozšířit terapeutické možnosti u některých nádorů. Klíčem může být identifikace regulačních procesů (cílení nebo regulace enzymové aktivity), které jsou nezbytné pro růst nádorových buněk [32].

1.5.2 Inhibitory V-ATPázy

V-ATPáza hraje důležitou roli při různých onemocněních a jsou studovány její inhibitory vhodné pro terapeutické účely. Ačkoliv se specializované V-ATPázy liší specifickými izoformami, nezdá se, že by to usnadnilo identifikaci inhibitorů těchto V-ATPáz. Zatím známé inhibitory jsou převážně z přírodních zdrojů, kdy jsou buňkami produkovány jako toxiny. Vzhledem k tomu, že struktura a mechanismy V-ATPázy jsou známy, lze použít reverzní chemické genetické postupy k identifikaci nových inhibitorů specializované podskupiny V-ATPáz. Mezi známé inhibitory patří například bafilomyciny A1, B1, C1, D1 a concanamycin ze skupiny Pleco macrolidů, které byly izolovány z bakterií rodu *Streptomyces*. Bafilomycin A1 byl identifikován jako první selektivní inhibitor V-ATPáz. Dalším velmi účinným inhibitorem je také archazolid A, který je produkován bakteriemi *Archangium gephyra* a *Cystobacter violaceus* a inhibuje savčí V-ATPázy v nanomolárních koncentracích. Jako primární vazebné místo pro tyto inhibitory byla identifikována podjednotka c V-ATPáz, ale existují i důkazy, že podjednotka a také přispívá k vazbě těchto inhibitorů. V současné době se uvádí, že tyto inhibitory přerušují rotaci c podjednotek [32]. V klinické praxi se však žádný z inhibitorů V-ATPáz nepoužívá a zatím proběhla ojedinělá klinická studie u mnohočetného myelomu [33].

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je sledovat expresi d podjednotky vakuolární ATPázy (*ATP6V0D1*) a *TFEB* u neuroblastomové buněčné linie senzitivní UFK-NB-4 a rezistentní vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} v normoxii a hypoxii. Výsledků bylo dosaženo dle následujícího postupu:

- Kultivace neuroblastomových buněčných linií
- Izolace RNA
- Stanovení exprese *ATP6V0D1* a *TFEB* kvantitativní polymerázovou řetězcovou reakcí v reálném čase (RT-PCR)

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

Carl Roth (Německo): merkaptoethanol

Generi Biotech (ČR): kit pro reverzní transkripci "Generi Biotech Reverse Transcription, kit"; primery: *POLR2A*, *ATP6V0D1*, *TFEB*; "Ideal PCR Master Mix"

Gibco (USA): sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS), fetální hovězí sérum (FBS), "Iscove's modified Dulbecco's" médium (IMDM) s glutaminem

Penta (ČR): ethanol, izopropylalkohol

Teva (Izrael): cisplatina

Therma Scientific (USA): kit pro izolaci RNA PureLink® RNA Mini Kit

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. (pro analýzu) nebo vyšší.

Neuroblastomové linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} byly darem prof. Jindřicha Činátla, DrSc. z Goetheho Univerzity ve Frankfurtu nad Mohanem. Linie UKF-NB-4 byla připravena z recidivy vysoce rizikového neuroblastomu s amplifikací MYCN do kostní dřeně a UKF-NB-4^{CDDP} byla připravena dlouhodobou kultivací linie UKF-NB-4 se stoupající koncentrací CDDP.

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace neuroblastomových buněčných linií

Senzitivní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a linie rezistentní vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} byly kultivovány v IMDM médiu obohaceném 10 % FBS. Kultivace probíhala při 37 °C s 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu v inkubátoru Jouan IGO 150 (USA). Rezistentní linie byly kultivovány s 3 µM cisplatinou pro udržení rezistence. Buněčné linie byly následně pasážovány 2x týdně, před vlastním experimentem byly rezistentní buňky kultivovány dvě pasáže bez cytostatika. Pasážování probíhalo tak, že nejprve byly buňky promyty PBS, k uvolnění buněk z povrchu kultivačních lahvíček byl použit 0,05 % roztok trypsinu v PBS. Po 10 minutách inkubace při 37 °C byly buňky resuspendovány v IMDM médiu s 10 % FBS a kultivovány v lahvíčkách o kultivační ploše 25 cm².

3.2.2 Příprava vzorků na experiment

Po kultivaci a následném resuspendování byly buňky počítány na počítadle BIO-RAD TC 20 (USA) a následně nasazeny na Petriho misky o kultivační ploše 60,1 cm² tak, aby v každé misce byl 1 milion buněk. Jedna miska byla inkubována v inkubátoru Jouan IGO 150 (USA) v normoxii, a druhá v hypoxii (1 % O₂). Hypoxie byla zajištěna hypoxickou komorou Biospherix (USA), která byla umístěna v inkubátoru.

Po inkubaci byly buňky uvolněny pomocí tzv. kultivační škrabky z Petriho misek a přeneseny do centrifugačních zkumavek. Následně byla buněčná suspenze centrifugována 3 minuty na 300 × g při laboratorní teplotě na centrifuze Universal 320 R (Německo). Peleta byla resuspendována v 1 ml PBS a následně opět centrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a peleta byla pro další práci zamražena a uskladněna v - 80 °C.

3.2.3 Izolace RNA

Z připravených vzorků byla izolována RNA za použití kitu PureLink[®] RNA Mini Kit v laminárním boxu Telstar AV-100 (Španělsko). Do každé mikrozkušavky se

vzorkem bylo přidáno 0,6 ml "Lysis Buffer" roztoku s 1 % 2 - merkaptoethanolem a zkumavky byly vortexovány na vortexu VELP SCIENTIFICA Rw (Itálie) do rozpuštění pelety. Do takto zhomogenizovaných roztoků byl přidán 70 % ethanol v poměru 1:1 a vzorky byly opět vortexovány. Dále byly vzorky přeneseny do sběrných zkumavek tzv. "collection tube" obsahující kolonku - "spin cartridge" a centrifugovány 15 vteřin při $12\,000 \times g$ a laboratorní teplotě na Eppendorf Centrifuge 5415 R (Německo), následně byl odstraněn filtrát. V dalších krocích byly vzorky RNA uvolněny z kolonky pomocí promývacích pufrů. Jako první bylo přidáno 700 μ l "Wash Buffer I" do "spin cartridge", které byly následně centrifugovány za stejných podmínek. Byl odstraněn filtrát a "spin cartridge" byl přesunut do nové "collection tube". V druhém kroku pročištění bylo přidáno 500 μ l "Wash Buffer II" a mikrozkušavky byly opět centrifugovány za stejných podmínek. Celý tento krok byl zopakován a mikrozkušavky byly opět centrifugovány za stejných podmínek. Na závěr pro vysušení pelety byly vzorky centrifugovány 2 minuty při $12\,000 \times g$ a laboratorní teplotě. "Collection tube" byla odstraněna a "spin cartridge" byl přesunut do "recovery tube". Dále bylo přidáno 30-100 μ l "RNase free" vody podle velikosti pelety. Směs byla inkubována 1 minutu při laboratorní teplotě, a následně centrifugována na Eppendorf Centrifuge 5430 R (Německo) při laboratorní teplotě a $12\,000 \times g$ tak, aby izolovaná RNA byla uvolněna z membrány do roztoku. Nakonec byla změřena koncentrace získané RNA na spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

3.2.4 Reverzní transkripce RNA

K reverzní transkripci RNA do komplementární DNA (cDNA) byla použita sada pro reverzní transkripci s inhibátorem RNAs Generi Biotech Reverse Transcription Kit. K vzorkům RNA (izolovaným dle kapitoly 3.2.3.) o koncentraci 1000 ng/ml bylo přidáno 10 μ l "Ideal Master Mixu", 2 μ l příslušného primeru a doplněno vodou zbavenou RNAs ("RNase free water") do 20 μ l. Příprava vzorků probíhala v boxu Bioair instruments Aura PCR (Itálie). Směs byla vložena do termocykleru SensoQuest Labcycler (Německo) a byl zvolen program nastavený na 42 °C po dobu 60 minut.

3.2.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce je metoda, která umožňuje kvantifikaci určitého úseku DNA v reálném čase. Oproti klasické PCR je zaznamenávána koncentrace produktu v každém cyklu v reálném čase. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescenčních sond, které se specificky nebo nespecificky váží na amplifikované DNA. Pro tuto metodu byly použity primery a sondy typu TaqMan *ATP6V0D1* a *TFEB* a kontrolní gen *POLR2A*. Každý vzorek obsahoval 10 μ l "Ideal Master Mixu", 2 μ l příslušného primeru s FAM fluorescenční značkou a 7 μ l vody zbavené RNAs ("RNase free water") a 1 μ l vzorku cDNA. Reakční směs byla připravována v 96 jamkových destičkách a každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Destičky byly vloženy do Applied Biosystems QuantStudio 3 a byly nastaveny podmínky:

95 °C po dobu 3 minut

50 cyklů:

95 °C po dobu 10 sekund

60 °C po dobu 20 sekund

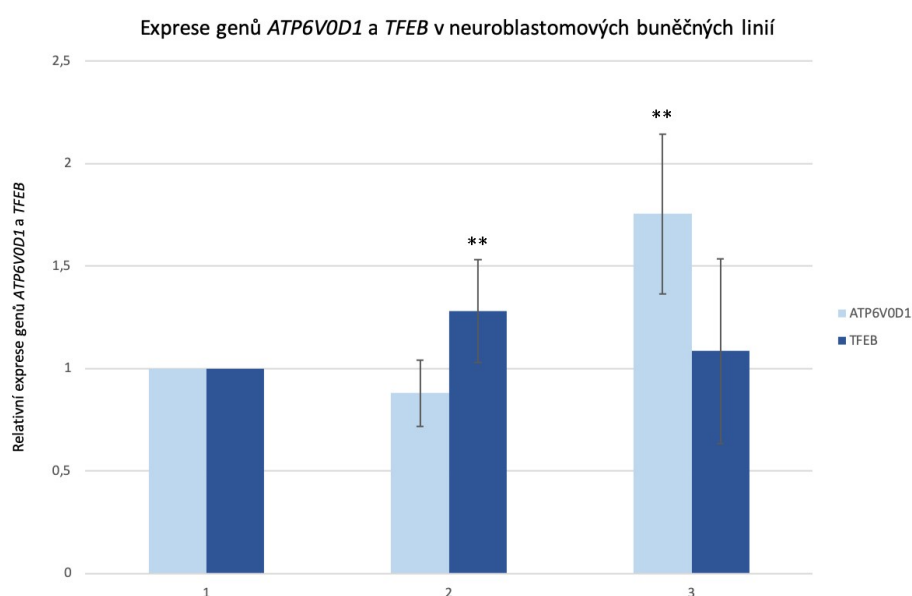
Vyhodnocení bylo provedeno v programu Rest 384 beta version, který určil hodnoty C_T , značící číslo cyklu, u kterého koncentrace produktu prořála prahovou hodnotu a vypočítala ΔC_T tedy rozdíl mezi C_T sledovaného a kontrolního genu. Jako standard byl použit gen *POLR2A*, jehož exprese se během experimentu nemění. Software umožnil také statistické hodnocení rozdílů ΔC_T jednotlivých vzorků. Použitý matematický model je založen na účinnosti PCR a průměrné odchylce mezi vzorkem a kontrolním genem. Následně je určena signifikantní změna zkoumaných genů pomocí randomizačního testu.

4. Výsledky

Tato bakalářská práce se zabývala změnou exprese d podjednotky V-ATPázy (*ATP6V0D1*) a transkripčního faktoru EB (*TFEB*) v prostředí normoxie a hypoxie.

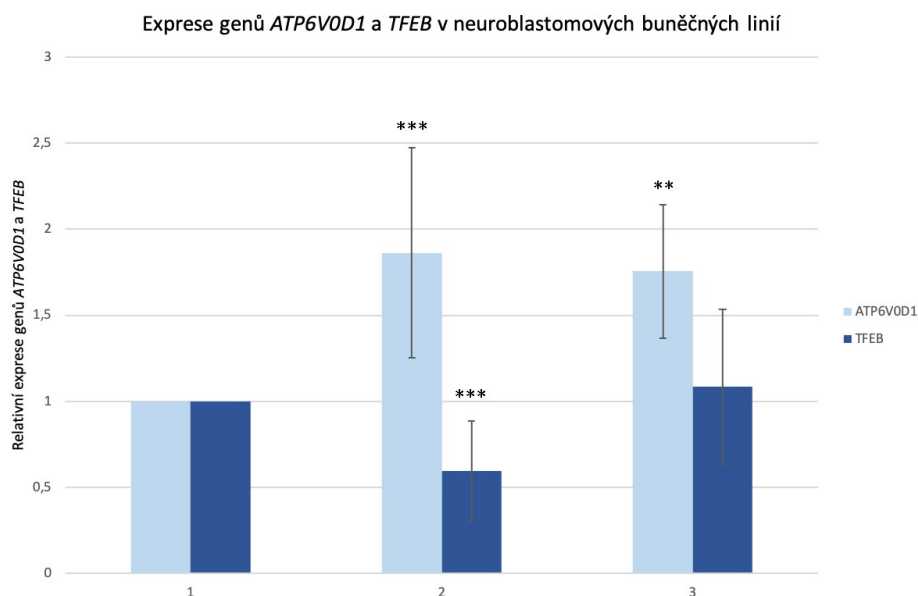
4.1 Sledování exprese genů *ATP6V0D1* a *TFEB* v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} metodou RT-PCR

Po inkubaci neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} v normoxii a hypoxii byla metodou RT-PCR a programem Rest 384 beta version vyhodnocena změna exprese jednotlivých genů. Porovnáním neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} vystavených hypoxii lze pozorovat, že hypoxické prostředí u senzitivní linie UKF-NB-4 vyvolalo zvýšení exprese *TFEB* a u rezistentní linie UKF-NB-4^{CDDP} došlo naopak ke zvýšení exprese *ATP6V0D1* oproti senzitivní linii UKF-NB-4 v normoxii (Obr. 11).



Obr. 11: Porovnání exprese genů *ATP6V0D1* a *TFEB* v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} inkubovaných v hypoxii. 1=kontrola: UKF-NB-4 v normoxii, 2: UKF-NB-4 v hypoxii, 3: UKF-NB-4^{CDDP} v hypoxii. Získané hodnoty jsou průměrem 3 na sobě nezávislých měření a data byla vyhodnocena pomocí programu Rest 384 beta version. Signifikance $p < 0,01$ označena **.

Dále byla porovnávána změna exprese genů v rezistentní linii UKF-NB-4^{CDDP} inkubované v normoxii a hypoxii. Inkubace v normoxii způsobila významné zvýšení exprese *ATP6V0D1* a významné snížení exprese *TFEB* oproti linii senzitivní UKF-NB-4 v normoxii. V hypoxii došlo pouze k zvýšení exprese *ATP6V0D1* (Obr. 12).



Obr. 12: Porovnání exprese genů *ATP6V0D1* a *TFEB* v neuroblastomové buněčné linii rezistentní vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} inkubované v normoxii a hypoxii. 1=kontrola: UKF-NB-4 v normoxii, 2: UKF-NB-4^{CDDP} v normoxii, 3: UKF-NB-4^{CDDP} v hypoxii. Získané hodnoty jsou průměrem 3 na sobě nezávislých měření a data byla vyhodnocena pomocí programu Rest 384 beta version. Signifikance $p < 0,01$ označena **, signifikance $p < 0,001$ označena ***.

5. Diskuze

Nádorová onemocnění jsou jedny z nejčastějších příčin úmrtí po celém světě. V posledních letech probíhá intenzivní rozvoj terapeutických metod, avšak stále je velmi obtížné léčit tato onemocnění. Jedním z největších problémů chemoterapie je vznik rezistence k cytostatikům, proto je důležité studovat tyto mechanismy jejího vzniku. V-ATPáza funguje jako protonová pumpa, tedy jako enzym, který acidifikuje některé organely včetně lysozomů. Lysozomální sekvestrace zabraňuje interakci léčivo-cíl, a tím tedy dosažení místa působení, kterým nejčastěji bývá jádro. Je to jeden z mechanismů, které mohou způsobit chemorezistenci vůči daným cytostatikům. Zvýšená aktivita a exprese V-ATPáz u nádorových buněk souvisí s chemorezistencí, progresí nádorů a metastázováním [30]. Nedávná studie ukázala, že regulace V-ATPázy proteinovým komplexem mTORC1 zahrnuje *TFEB*, který je nezbytný pro expresi velké skupiny genů reagujících na mTORC1. *TFEB* tedy může regulovat hladinu V-ATPázy a lysozomální aktivitu [27]. Tato bakalářská práce se zaměřila na sledování exprese d podjednotky vakuolární ATPázy (*ATP6V0D1*) a transkripčního faktoru EB (*TFEB*) v různém prostředí - v normoxii a hypoxii. Sledování probíhalo v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a od ní odvozené rezistentní vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}.

V předchozích studiích bylo zjištěno, že se hypoxie významně podílí na chemorezistenci a agresivnějším chování karcinomů. Změny exprese genů indukovaných hypoxií, které se podílejí na jejich vzniku a následné progresi byly prokázány u řady nádorů. Metodou RT-PCR jsme zjistili, že prostředí hypoxie zvyšuje expresi genu *TFEB* u senzitivní linie neuroblastomových buněk UKF-NB-4, a naopak u rezistentní linie UKF-NB-4^{CDDP} zvyšuje expresi genu *ATP6V0D1*. U senzitivní linie tedy došlo oproti rezistentní k zvýšení exprese *TFEB*. Změněná exprese genů umožňuje buňkám adaptovat se na hypoxické podmínky (Obr. 11). Adaptace nádorových buněk na hypoxické podmínky přispívá k agresivní povaze nádorů a jejich dediferenciaci a chemorezistenci [24]. Sledováním exprese genů *ATP6V0D1* a *TFEB* v rezistentní neuroblastomové linii UKF-NB-4^{CDDP} v normoxii jsme zjistili, že se exprese obou genů významně změnila - u *ATP6V0D1* se exprese zvýšila a u *TFEB* se snížila. Porovnání výsledků u neuroblastomových rezistentních linií v normoxii a hypoxii ukazuje, že hypoxie snižuje citlivost neuroblastomových linií a také rezistenci k danému cytostatiku. Obr. 12 ukazuje, že gen *ATP6V0D1* v neuroblastomové buněčné linii rezistentní vůči cisplatině UKF-NB-

4^{CDDP} se mnohem lépe adaptuje na hypoxické podmínky než *TFEB*. Výsledky potvrzují, že hypoxické podmínky mají významný vliv na vznik chemorezistence.

Nedostatek kyslíku během léčby některými cytostatiky vede ke zvýšení rezistence nádorové tkáně k chemoterapii a radioterapii. Hypoxie může podporovat angiogenezi, která umožňuje progresi a metastázování nádoru [24]. Zjištěné výsledky tedy mohou přispět ke studiu podílu hypoxie na vlastnostech nádoru a hypoxií navozené rezistence vůči daným cytostatikům.

6. Závěr

V této práci bylo metodou RT-PCR zjištěno, že hypoxie zvyšuje expresi genu *TFEB* u senzitivní linie neuroblastomových buněk UKF-NB-4, a naopak u rezistentní linie UKF-NB-4^{CDDP} zvyšuje expresi *ATP6V0D1*. Tyto výsledky svědčí pro úlohu V-ATPázy při vzniku chemorezistence.

Použitá literatura

- [1] Masarykova univerzita, “Úvod do problematiky dětské onkologie”, 2019. [Online]. Available: <http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/detska-onkologie/index.php?pg=obecna-onkologie--uvod>. (cit. 31.5. 2019)
- [2] J. I. Johnsen, *et al.*, “Neuroblastoma—A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 12, pp. 1–11, 2019.
- [3] J. Stříteský, *Patologie*, 2001.
- [4] M. Tsokos, “Neuroblastoma,” *National Cancer Institute*, 2001. [Online]. Available: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2593>. (cit. 3.6.2019)
- [5] Z. Adam, *et al.*, *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*, 2004.
- [6] Z. Adam, *et al.*, *Speciální onkologie*, 2010.
- [7] J. M. Maris, *et al.*, “Neuroblastoma Seminar,” *Lancet*, vol. 369, 2007.
- [8] G. M. Brodeur, “Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 3, pp. 203–216, 2003.
- [9] P. Klener, *Klinická onkologie*, 2002.
- [10] V. P. Tolbert, *et al.*, “Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment,” *Cell Tissue Res.*, vol. 372, no. 2, pp. 195–209, 2018.
- [11] S. Hynie, *Farmakologie v kostce*, 2001.
- [12] Z. Adam, *et al.*, *Obecná onkologie*, 2011.
- [13] H. Lüllmann, *et al.*, *Barevný atlas farmakologie*, 2004.
- [14] E. R. Jamieson, *et al.*, “Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts,” *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2467–2498, 1999.
- [15] P. Klener, *Protinádorová chemoterapie*, 1996.
- [16] M. Rodrigo, *et al.*, “Proteomic Signature of Neuroblastoma Cells UKF-NB-4 Reveals Key Role of Lysosomal Sequestration and the Proteasome Complex in Acquiring Chemoresistance to Cisplatin,” *J. Proteome Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 1255–1263, 2019.
- [17] M. Rodrigo, *et al.*, “Transcriptomic Landscape of Cisplatin-Resistant Neuroblastoma Cells,” *Cells*, vol. 8, no. 3, p. 235, 2019.
- [18] Benrr101, “Cisplatin,” 2012. [Online]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cisplatin-stereo.svg>. (cit. 3.5. 2019)
- [19] L. Galluzzi, *et al.*, “Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and

- future,” *Cell Death Dis.*, vol. 5, no. 5, 2014.
- [20] Z. H. Siddik, “Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance,” *Oncogene*, vol. 22, no. 47 REV. ISS. 6, pp. 7265–7279, 2003.
 - [21] M. Duvvuri, *et al.*, “A Chemical Strategy To Manipulate the Intracellular Localization of Drugs in Resistant Cancer Cells,” *Biochemistry*, p. 44, 2005.
 - [22] J. Hraběta, *et al.*, “Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells,” pp. 1–10, 2015.
 - [23] P. Saftig, *Lysosomes*, Medical in, 2005.
 - [24] H. Doktorova, *et al.*, “Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells : The role of not only HIF-1,” 2015.
 - [25] G. Napolitano, *et al.*, “TFEB at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 13, pp. 2475–2481, 2016.
 - [26] K. Pena, “Copper-Induced Activation of Transcription factor EB and Its Dual”, 2017.
 - [27] S. Peña-Llopis, *et al.*, “Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1,” *EMBO J.*, vol. 30, no. 16, pp. 3242–3258, 2011.
 - [28] M. Palmieri, *et al.*, “Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 19, pp. 3852–3866, 2011.
 - [29] V. Marshansky, *et al.*, “Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1837, no. 6, pp. 857–879, 2014.
 - [30] J. Hraběta, *et al.* “Intracelulární vychytávání elipticinu – příčina chemorezistence a možnost zesílení účinku?”, *Brněnské onkologické dny a XXVI. Konference pro sestry a laboranty*, 2012.
 - [31] K. W. Beyenbach, “The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation,” *J. Exp. Biol.*, vol. 209, no. 4, pp. 577–589, 2006.
 - [32] L. S. Holliday, “Vacuolar H⁺ -ATPase: An Essential Multitasking Enzyme in Physiology and Pathophysiology,” *New J. Sci.*, pp. 1–21, 2014.
 - [33] M. Hiasa, *et al.*, “Bone Pain Induced by Multiple Myeloma Is Reduced by Targeting V-ATPase and ASIC3,” pp. 1283–1296, 2017.

"Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů."

[illegible]